

## Cara uji mikrobiologi -Bagian 5: Penentuan *Vibrio parahaemolyticus* pada produk perikanan





## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan .....	2
5 Media dan pereaksi (Lihat lampiran E dan F ).....	2
6 Kondisi pengujian .....	3
7 Pengambilan contoh .....	3
8 Prosedur .....	4
9 Interpretasi hasil .....	7
10 Pelaporan hasil .....	8
11 Keamanan dan keselamatan kerja .....	8
Lampiran A (informatif) Karakteristik Biokimia Vibrionaceae yang terdapat pada makanan laut.....	10
Lampiran B (normatif) Angka Paling Memungkinkan / APM dengan seri tabung pengenceran .....	11
Lampiran C (normatif) Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran $10^1$ , $10^2$ dan $10^3$ .....	13
Lampiran D (normatif) Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pada pengenceran $10^1$ , $10^2$ dan $10^3$ .....	14
Lampiran E (normatif) Pembuatan media.....	15
Lampiran F (normatif) Pembuatan pereaksi .....	20
Bibliografi .....	23



## Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode Uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari SNI 01-2340 -1991 yang disusun oleh panitia teknis perikanan dalam rangka perbaikan setelah lima tahun yang telah dirumuskan melalui rapat-rapat teknis, rapat prakonsensus dan rapat konsesus pada tanggal 25 Nopember 2005 di Jakarta. Dihadiri oleh wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

- 1 Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 21/MEN/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Data verifikasi metode penentuan *Vibrio parahaemolyticus* pada produk perikanan. Laboratorium Mikrobiologi BPPMHP 2004.



## Cara uji mikrobiologi -Bagian 5: Penentuan *Vibrio parahaemolyticus* pada produk perikanan

### 1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk mendeteksi, mengisolasi dan mengkonfirmasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada produk perikanan.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **Inkubasi**

pengkondisian mikroorganisma untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

#### 2.2

##### **koloni terduga**

koloni-koloni yang tumbuh pada media agar selektif dan memberikan ciri-ciri *V. parahaemolyticus* yang khas. Koloni-koloni ini dikonfirmasi untuk meyakinkan benar tidaknya *V. parahaemolyticus*

#### 2.3

##### **media pengkayaan**

media yang digunakan untuk memperbaiki sel-sel bakteri yang rusak atau meningkatkan jumlah populasi bakteri

#### 2.4

##### **media selektif**

media yang mengandung bahan-bahan selektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri selain bakteri yang dianalisa

#### 2.5

##### **media agar**

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisma

#### 2.6

##### **mikroorganisma**

kelompok organisma yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat dibawah mikroskop

#### 2.7

##### **produk perikanan**

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan / atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

#### 2.8

##### ***Vibrio parahaemolyticus***

bakteri *Halophilic* yang secara alami terdapat pada hewan dan perairan estuaria, termasuk dalam genus *Vibrio* sp, Gram-negatif, berbentuk batang atau batang melengkung dan bersifat anaerob fakultatif



### 3 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan dideteksi dengan menumbuhkan pada media agar selektif. Koloni yang diduga *V. parahaemolyticus* pada media agar selektif diisolasi dan dikonfirmasi melalui uji biokimia untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *V. parahaemolyticus*.

### 4 Peralatan

- a) Blender beserta jar yang dapat disterilisasi atau stomacher beserta plastik steril
- b) Cawan petri ukuran 15 mm x 100 mm
- c) Tabung reaksi ukuran 16 mm x 125 mm dan ukuran 13 mm x 100 mm
- d) Tabung bertutup ukuran 16 mm x 150 mm
- e) Timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 g dan 0,0001 g
- f) Inkubator  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- g) *Waterbath*  $42^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$
- h) *Autoclave*  $121^{\circ}\text{C}$
- i) Jarum ose dan jarum inokulasi / tanam
- j) Bunsen
- k) pH meter
- l) *Hotplate* dilengkapi dengan *magnetic stirer*
- m) Alat pengocok (*vortex mixer*)
- n) Peralatan sterilisasi filter
- o) Oven
- p) Mikroskop
- q) Pipet atau pippetor 1 ml, 5 ml dan 10 ml

### 5 Media dan pereaksi (Lihat lampiran E dan F )

- a) *Alkaline Peptone Water* (APW) ( E.1)
- b) *Alkaline Peptone Salt* (APS) (E.2)
- c) *Decarboxylase basal medium* dengan penambahan suplemen *arginine*, *lysine* dan *ornithine* secara individual (E.3)
- d) *Kliger Iron Agar* (KIA) (E.4)
- e) *Motility Test medium, Semisolid* (E.5)
- f) *MR-VP Broth* (E.6)
- g) *Purple Broth Base* (PBB) dengan penambahan suplemen *sucrose*, *lactose*, *cellobiose*, *arabinose*, *D-mannitol* atau *D-mannose* secara individual (E.7)
- h) *OF medium Semisolid* dengan penambahan suplemen *glucose*, *sucrose*, *lactose*, *cellobiose*, *arabinose*, *D-mannitol* atau *D-mannose* secara individual (E.8).
- i) *Triple Sugar Iron* (TSI) agar (E.9)
- j) *Thiosulfate-Citrate-Bile-Salts-Sucrose* (TCBS) Agar (E.10)
- k) *Trypticase (tryptic) Soy Broth* (TSB) (E.11)
- l) *Trypticase (tryptic) Soy Agar* (TSA) (E.12)
- m) *Tryptone Broth* dan *Tryptone Salt Broths* ( $T_1N_0$ ,  $T_1N_1$   $T_1N_3$   $T_1N_6$   $T_1N_8$   $T_1N_{10}$ ) (E.13)
- n) *Urea Broth* (E.14)
- o) Pereaksi Kovacs (F.1)
- p) Mineral atau *Parafin Oil steril* (F.2)
- q) O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) disk, 10  $\mu\text{g}$  dan 150  $\mu\text{g}$  (F.3)
- r) ONPG disk (F.4)
- s) Pereaksi oksidase (F.5)



- t) HCl 1 N (F.6)
- u) Larutan *Physiological Saline* 0,85% (F.7)
- v) *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), pH 7,4 (F.8)
- w) NaCl 2% dan 3% (F.9)
- x) NaOH 1 N (F.10)
- y) Pereaksi VP (F.11)
- z) Pereaksi pewarnaan Gram (F.12)
- aa) Baku pembanding *Vibrio parahaemolyticus*

**CATATAN** Media yang digunakan dalam pengujian *V. parahaemolyticus* memerlukan penambahan NaCl 2% sampai dengan 3% dari konsentrasi akhir kecuali **Lampiran E.13**

## 6 Kondisi pengujian

Selama melakukan pengujian, terapkan teknis aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau *laminar air flow* yang terkontrol. Media TCBS agar yang digunakan dalam keadaan kering.

**CATATAN** Khusus untuk monitoring kekerangan, contoh kerang diuji dalam keadaan segar jangan dibekukan.

## 7 Pengambilan contoh

Komposisi dan berat contoh yang akan diuji diambil dengan ketentuan sebagai berikut:

### 7.1 Komposisi contoh

#### 7.1.1 Ikan

Jaringan daging, saluran pencernaan dan insang

#### 7.1.2 Crustacea

Jika memungkinkan seluruh tubuh atau hanya bagian tengah termasuk insang dan saluran pencernaan.

#### 7.1.3 Kekerangan

Daging kerang termasuk cairan dalam cangkang.

### 7.2. Berat contoh

#### 7.2.1 Produk kekerangan

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil secara komposit daging kerang termasuk cairan dalam cangkang dari 10 kerang hingga 12 kerang lalu homogenkan, disesuaikan dengan berat contoh.



## 7.2.2 Produk perikanan selain kekerangan

### 7.2.2.1 Kurang dari 1 kg

Dengan menerapkan teknik aseptis ambil contoh secara acak dan potong kecil-kecil hingga beratnya mencapai 100 g.

### 7.2.2.2 Antara 1 kg sampai dengan 4,5 kg

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 300 g.

### 7.2.2.3 Lebih besar 4,5 kg

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 500 g.

**CATATAN** Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa. Pelelahan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2°C-5°C atau pada suhu 45°C tidak selama tidak lebih dari 15 menit.

## 8 Prosedur

### 8.1 Persiapan contoh

8.1.1 Timbang 50 g contoh secara aseptis sesuai butir 7.

8.1.2 Lakukan pengenceran 1 : 10 dengan menghomogenkan 50 g contoh menggunakan larutan NaCl 2% atau *Phosphat Buffer Saline* (PBS) selama 2 menit. Pengenceran dapat juga dilakukan dengan menghomogenkan 50 g contoh dengan 50 ml larutan pengencer (1:2). Selanjutnya buat larutan 1 : 5 dengan cara menimbang 20 g dari homogenat 1:2 dimasukkan ke dalam 80 ml larutan pengencer sehingga didapatkan homogenat contoh dengan pengenceran 1:10 atau disebut larutan 10<sup>1</sup>.

### 8.2 Pengkayaan

8.2.1 Siapkan seri pengenceran 10<sup>2</sup> dengan cara melarutkan 1 ml larutan 10<sup>1</sup> ke dalam 9 ml larutan pengencer NaCl 3% atau PBS. Lakukan pengenceran yang lebih tinggi sesuai dengan pendugaan kepadatan populasi contoh. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali.

8.2.2 Dengan menggunakan pipet steril, pindahkan sebanyak 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung pengenceran yang berisi 10 ml *Alkaline Peptone Water* (APW) atau *Alkaline Peptone Salt* (APS) (lihat skema penentuan).

8.2.3 Inkubasikan tabung-tabung tersebut pada suhu 36°C ± 1°C selama 16 – 18 jam.

**CATATAN** Selesaikan inokulasi contoh ke dalam seri tabung pengenceran dalam waktu 15 menit – 20 menit setelah persiapan contoh

### 8.3 Isolasi *Vibrio parahaemolyticus*

8.3.1 Tanpa mengocok tabung (8.2.3) ambil 1 ose penuh dari setiap tabung yang positif (keruh) pada setiap pengenceran sedalam 1 cm dari permukaan cairan dan goreskan ke dalam TCBS agar. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam.



**8.3.2** Amati keberadaan *V. parahaemolyticus* pada TCBS agar. Koloni *V. parahaemolyticus* berbentuk bundar, diameter 2 mm – 3 mm, berwarna hijau atau hijau kebiruan.

#### 8.4 Pemurnian

Ambil 3 atau lebih koloni yang khas (*typical*) atau yang diduga *V. parahaemolyticus* dari TCBS agar lalu goreskan ke dalam T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> agar miring atau TSA miring. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam. Kultur pada media ini digunakan untuk analisa biokimia.

#### 8.5 Uji biokimia pendahuluan

##### 8.5.1 Uji oksidase

Goreskan 1 ose dari T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> agar miring atau TSA miring atau *medium* lain yang tidak memfermentasi karbohidrat ke dalam cawan petri yang berisi TSA. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam. Teteskan 2 – 3 tetes pereaksi oksidase pada koloni bakteri dan amati reaksinya. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua pada koloni. Uji oksidase dapat juga dilakukan dengan menggunakan kertas oksidase dengan cara menggoreskan koloni dari T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> agar miring atau TSA miring ke atas permukaan kertas oksidase menggunakan tusuk gigi (jangan menggunakan ose yang terbuat dari nikel atau krom). Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua secara cepat.

##### 8.5.2 Uji sensitifitas terhadap 0 / 129 vibriostat

Goreskan 1 ose dengan rapat dari T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> agar miring atau TSA miring ke dalam cawan petri yang berisi TSA. Letakkan disk 0/129 10 µg dan 150 µg pada goresan yang paling rapat dan inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam. Amati pertumbuhan disekitar disk. Reaksi sensitif ditunjukkan dengan terbentuknya zona disekitar disk (S), sedangkan reaksi resisten ditandai dengan adanya pertumbuhan disekeliling disk (R). *V. parahaemolyticus* resisten terhadap 0 / 129 10 µg dan sensitif terhadap 0 / 129 150 µg.

##### 8.5.3 Triple Sugar Iron (TSI) Agar dan Kliger Iron Agar (KIA)

Inokulasikan koloni dari T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> agar miring atau TSA miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak media TSI agar dan KIA. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam. *V. parahaemolyticus* menghasilkan alkalin (warna merah) pada agar miring, asam (warna kuning) pada agar tegak dan tidak menghasilkan gas serta H<sub>2</sub>S. Reaksi *Vibrio* spp dalam beberapa media agar miring yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1 Reaksi *Vibrio* spp dalam beberapa media agar miring yang berbeda**

Bakteri	KIA		TSI	
	Agar miring	Agar tegak	Agar miring	Agar tegak
<i>V. cholerae</i>	K	A	A (K jarang)	A
<i>V. mimicus</i>	K	A	K (A jarang)	A
<i>V. para haemolyticus</i>	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A
<i>V. vulnificus</i>	K atau A	A	K (jarang)	A
<i>A. hydrophilia</i>	K atau A	A	K atau A	A
<i>P. shigelloides</i>	K atau A	A	K atau A	A
Sumber : BAM, FDA, 1998				
<b>CATATAN :</b>				
K adalah alkaline				
A adalah asam				



#### 8.5.4 *Motility Test medium (MTM)*

Inokulasikan koloni dari  $T_1N_1$  agar atau TSA miring ke dalam tabung MTM dengan kedalaman 2/3 dari tinggi media MTM. Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 18 jam – 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri yang berdifusi secara sirkular dari garis tusukan.

#### 8.5.5 Uji ONPG

Untuk uji ONPG gunakan kultur dari TSI atau media lain yang mengandung *lactose*. Inokulasikan 1 ose kultur dari TSI ke dalam tabung yang berisi 0,5 ml larutan *Physiological Saline*. Masukkan 1 *disk* ONPG lalu inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 20 menit sampai dengan 1 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada media dalam tabung.

#### 8.5.6 Uji Oksidatif – Fermentatif (OF)

Inokulasikan 2 tabung kedalam media OF yang telah ditambahkan glukosa 1% dengan kultur dari  $T_1N_1$  agar miring atau TSA miring. Tambahkan mineral oil steril setinggi 1 cm - 2 cm kedalam salah satu tabung. Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 2 hari. Reaksi oksidatif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning (reaksi asam) pada tabung yang tidak ditambahkan dengan mineral oil, sedangkan reaksi fermentatif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada tabung yang ditambahkan mineral oil. Asam mengubah media dari warna hijau menjadi kuning.

#### 8.5.7 Pewarnaan Gram

Buat pewarnaan Gram dari setiap koloni terduga *V. parahaemolyticus*. Kultur diambil dari  $T_1N_1$  agar miring atau TSA miring yang telah diinkubasikan selama 24 jam. Bakteri *V. parahaemolyticus* termasuk Gram-negatif, berbentuk batang atau batang melengkung, bersifat anaerob fakultatif.

### 8.6 Uji Biokimia lanjutan

Lanjutkan pengujian apabila pada uji biokimia pendahuluan diatas ditemukan reaksi *V. parahaemolyticus* yang khas (Tabel 1).

Goreskan kembali kultur dari  $T_1N_1$  agar miring atau TSA miring ke TSA miring dan TSB. Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 18 jam – 24 jam.

#### 8.6.1 Uji Arginin *dihydrolase*, *Lysine dekarboksilase*, dan ornithin *dekarboksilase*

Inokulasikan kultur dari TSA miring kedalam 3 tabung media dasar *dekarboksilase* yang masing-masing mengandung arginin, *lysine* dan ornithin serta ke dalam 1 tabung kontrol media dasar *dekarboksilase* yang tidak mengandung asam amino. Tambahkan masing-masing tabung dengan mineral oil steril setinggi 1 cm – 2 cm. Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 4 hari. Lakukan pengamatan setiap hari. Reaksi *dekarboksilase* terhadap *asam amino* menghasilkan pH alkaline dan mengubah media menjadi ungu cerah (reaksi positif). Sedangkan reaksi fermentasi glukosa menghasilkan asam dan mengubah media menjadi warna kuning (reaksi negatif). Tabung kontrol yang tidak mengandung *asam amino* berubah menjadi kuning. *V. parahaemolyticus* menghasilkan reaksi negatif pada arginin, sedangkan pada media *lysine* dan ornithin menghasilkan reaksi positif.



### 8.6.2 Uji toleransi terhadap garam

Inokulasikan kultur dari TSB kedalam masing-masing *Tryptone Broth* 1% yang mengandung 0%; 1%; 3%; 6%; 8% dan 10% NaCl ( $T_1N_0$ ,  $T_1N_1$ ,  $T_1N_3$ ,  $T_1N_6$ ,  $T_1N_8$ ,  $T_1N_{10}$ ). Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , selama 18 jam – 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan pertumbuhan. *V. parahaemolyticus* tidak tumbuh dalam media  $T_1N_0$  dan  $T_1N_{10}$  (Tabel 3)

### 8.6.3 Uji pertumbuhan pada suhu $42^\circ\text{C}$

Inokulasikan 1 ose dari TSB yang telah diinkubasikan selama 24 jam ke dalam TSB yang telah dihangatkan dalam *Waterbath*  $42^\circ\text{C}$ . Inkubasikan pada suhu  $42^\circ\text{C}$  dalam *Waterbath* selama 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan. *V. parahaemolyticus* mampu tumbuh pada suhu  $42^\circ\text{C}$  (Tabel 3)

### 8.6.4 Uji Voges-Proskauer

Inokulasikan 1 ose dari TSA miring ke dalam MR-VP *Broth*. Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 2 hari. Pindahkan 1 ml dari setiap MR-VP *Broth* yang menunjukkan pertumbuhan ke dalam tabung reaksi ukuran 13 mm x 100 mm steril. Tambahkan 0,6 ml larutan *alphannaphthol* dan 0,2 ml KOH 40% lalu kocok. Tambahkan sedikit kristal kreatin untuk mempercepat reaksi. Kocok kembali dan diamkan selama 2 jam. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda sampai merah mirah delima (ruby) pada media. *V. parahaemolyticus* menghasilkan reaksi VP negatif.

### 8.6.5 Uji fermentasi karbohidrat

Inokulasikan 1 ose dari TSA miring kedalam masing-masing satu tabung *Purple Broth Base* yang mengandung *sucrose*, *lactose*, *D-mannitol*, *mannosa*, *arabinosa* atau *cellobiose*. Tambahkan masing-masing tabung dengan mineral oil steril setinggi 1 cm – 2 cm. Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 4 hari - 5 hari dan lakukan pengamatan setiap hari. Reaksi positif fermentasi karbohidrat menghasilkan asam dan mengubah media menjadi kuning (Tabel 2)

### 8.6.6 Uji hidrolisis urea

Inokulasikan 1 ose dari TSA miring ke dalam media *Urea*. Inkubasikan pada suhu  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  selama 18 jam. Strain-strain *V. parahaemolyticus* mempunyai kemampuan yang bervariasi dalam menghidrolisis *urea*.

## 9 Interpretasi hasil

**Tabel 2 Karakteristik minimal uji biokimia untuk identifikasi *V. parahaemolyticus***

No.	Jenis uji	Interpretasi hasil
1.	Morfologi	Gram-negatif, bentuk batang atau batang melengkung
2.	TSI	Agar miring: alkalin; Agar tegak: asam
3.	Oksidatif / fermentatif ( media OF)	Oksidatif dan fermentatif
4.	Oksidase	Positif
5.	Arginin Dehidrolase	Negatif



Tabel 2 (Lanjutan)

No.	Jenis uji	Interpretasi hasil
6.	<i>Lysine Dekarboksilase</i>	Positif
7.	VP	Negatif
8.	Pertumbuhan pada suhu 42°C	Positif
9.	<i>Halophilik</i>	T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> : negatif; T <sub>1</sub> N <sub>3</sub> , T <sub>1</sub> N <sub>6</sub> , T <sub>1</sub> N <sub>8</sub> : positif; T <sub>1</sub> N <sub>10</sub> : negatif atau hanya sedikit yang positif
10.	Fermentasi <i>sucrosa</i>	Negatif
11.	ONPG	Negatif
12.	Fermentasi <i>arabinose</i>	Negatif
13.	Sensitifitas terhadap 0/129	Resisten(R) terhadap 10 µg Sensitif (S) terhadap 150µg

## 10 Pelaporan hasil

Laporkan hasil *Vibrio parahaemolyticus* dalam APM / g , menggunakan Tabel Angka Paling Memungkinkan berdasarkan Lampiran A, B dan C

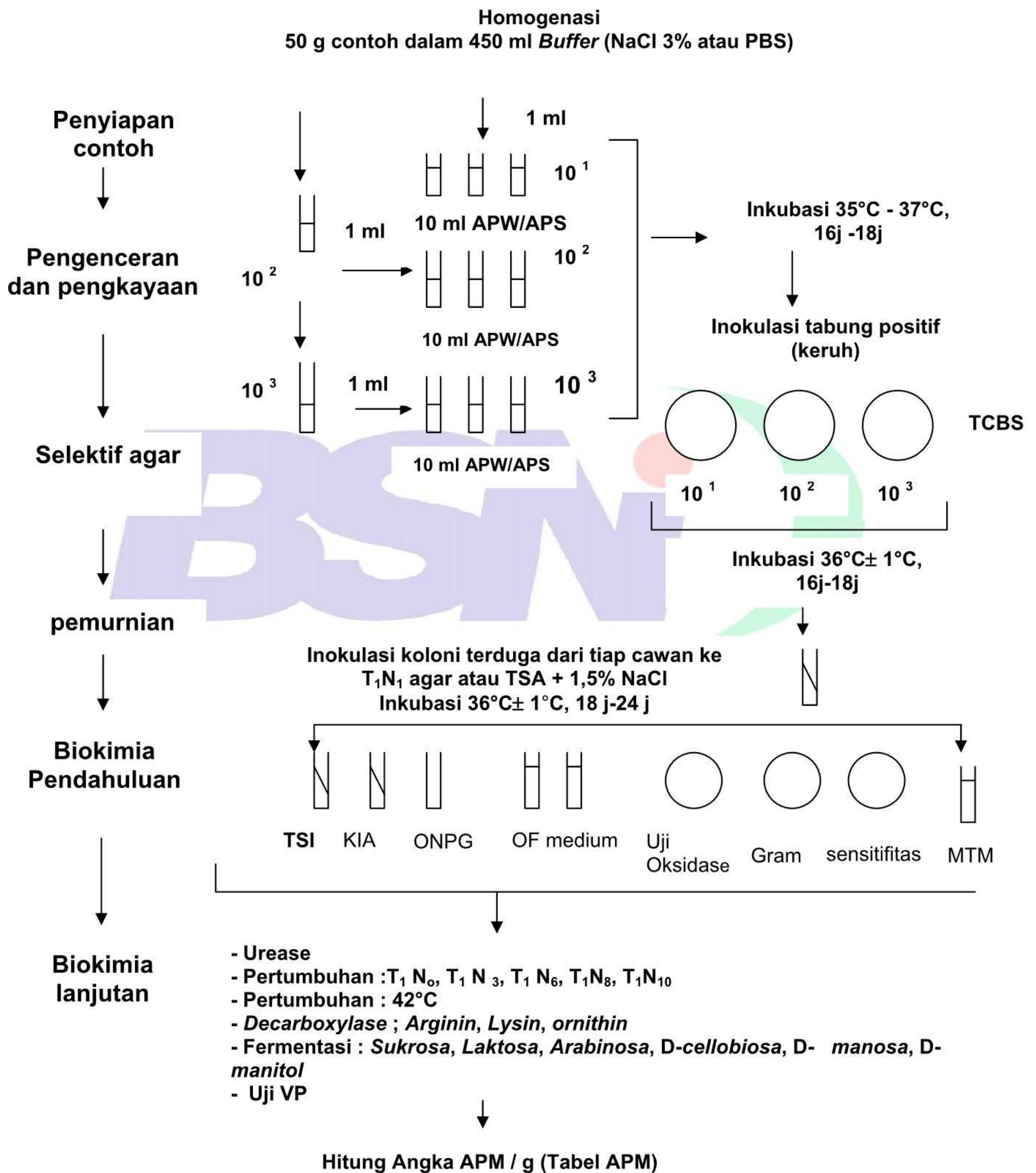
## 11 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka dilakukan hal-hal sebagai berikut :

- Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa
- Gunakan jas lab selama melakukan analisa
- Lakukan analisa di dalam laminar air flow
- Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisa
- Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan
- Media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dicuci



### Skema penentuan *Vibrio parahaemolyticus*





## Lampiran A (Informatif)

### Karakteristik Biokimia Vibrionaceae yang terdapat pada makanan laut

		<i>V. algi-nolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschni-kovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophilia</i> **	<i>P. shigelloides</i> **
TCBS agar		K	K	K	K	H	K	H	H	H	K	H
<i>Oxidase</i>		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Arginine dihydrolase</i>		-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Ornithine Decarboxylase</i>		+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lysine Decarboxylase</i>		+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
Pertumbuhan w/v:	0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
	3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-	-	-
	10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada suhu 42°C		+	+	V	-	Td	V	+	+	+	V	+
Asam dari:	<i>Sucrose</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	V	-
	<i>D-Cellobiose</i>	-	-	+	-	-	-	-	V	+	+	-
	<i>Lactose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-
	<i>Arabinose</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V	-
	<i>D-Mannose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-
	<i>D-Mannitol</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	-
	<i>ONPG</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	<i>Voges-Proskauer</i>	+	V	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Sensitifitas terhadap:	10 µg O/129	R	S	R	R	Td	S	S	R	S	R	S
	150 µg O/129	S	S	S	S	Td	S	S	S	S	R	S
	<i>Urease</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

\*\* *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*

TCBS : Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose

K : kuning

H : hijau

S : Sensitif R : Resisten

V : variabel Td : tidak dilakukan

Sumber : BAM, FDA, 1998



## Lampiran B (normatif)

### Angka Paling Memungkinkan / APM dengan seri tabung pengenceran

#### B.1 Latar belakang

Metoda untuk menduga jumlah bakteri dalam suatu produk, dapat menggunakan metoda hitungan mikroskopis, metoda hitungan cawan dan penentuan Angka Paling Memungkinkan (APM). Organisma yang mati maupun hidup dapat dihitung dengan metoda hitungan mikroskopis, akan tetapi pada APM hanya organisme hidup yang dapat dihitung.

Metoda APM adalah metoda untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan *medium* cair dalam tabung reaksi yang pada umumnya setiap pengenceran menggunakan 3 atau 5 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statistik. Tabung positif ditunjukkan oleh adanya pertumbuhan bakteri dan gas. Nilai APM ini diperoleh dengan anggapan sebagai berikut:

- a) Bakteri dalam contoh menyebar secara random.
- b) Bakteri dalam contoh tidak berkelompok atau cluster, tetapi saling terpisah.
- c) Organisma yang terdapat dalam contoh dapat tumbuh dalam *medium* selama inkubasi.
- d) Kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan, seperti media dan waktu inkubasi.

Di dalam penggunaan seri tabung pengenceran tingkat pengenceran yang diperlukan didasarkan pada pendugaan populasi bakteri yang ada dalam contoh. Hasil yang baik adalah jika pada pengenceran yang lebih rendah contoh yang diduga lebih banyak menunjukkan hasil uji positif (adanya pertumbuhan bakteri) dan pada pengenceran lebih tinggi contoh yang diduga lebih sedikit menunjukkan hasil uji negatif (tidak ada pertumbuhan bakteri). Oleh karena itu jumlah populasi bakteri yang ada dalam contoh diduga tinggi maka contoh diencerkan sampai diperoleh tingkat pengenceran yang lebih tinggi sehingga nilai APM maksimum yang dapat dihitung. Metoda pengenceran yang paling mudah adalah dengan melakukan pengenceran 10 kali lipat dengan menggunakan 3 atau 5 seri tabung pengenceran.

Metoda APM digunakan untuk menduga organisme dalam jumlah sedikit (kurang dari 100 / g) terutama susu, air dan makanan yang mempunyai partikel-partikel lain yang mungkin mengganggu keakurasian perhitungan. Kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh cukup untuk memberikan hasil yang signifikan dan umumnya terdapat dalam Tabel APM, sedangkan kombinasi yang tidak mungkin diabaikan. Tabel APM mempunyai tingkat kepercayaan 95%. Jika kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh tidak termasuk dalam tabel APM maka contoh yang asli dilakukan pengujian kembali. Dan jika ini tidak dapat dilakukan, maka analisis membandingkan dengan tabel APM yang lain untuk menghitung nilai APM berdasarkan hasil yang diperoleh.

#### B.2 Cara pemilihan kombinasi tabung positif pada 3 dan 5 seri tabung pengenceran dalam tabel APM

Penentuan APM dihitung berdasarkan jumlah seri tabung positif pada beberapa pengenceran yang digunakan yang didasarkan pada 3 atau 5 seri tabung pengenceran yang



digunakan. Kombinasi yang diambil adalah 3 tingkat pengenceran dengan kaidah sebagai berikut:

**Kasus 1 Seluruh tabung pada seri tabung pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , dst) menunjukkan reaksi positif**

a Pilih tingkat pengenceran tertinggi yang menghasilkan seluruh tabung positif dan 2 pengenceran berikutnya, seperti contoh a dan b (Tabel A)

b Jika pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran  $10^3$  menghasilkan 1 tabung positif) maka tingkat pengenceran tersebut tingkat pengenceran tertinggi yang dipilih, seperti pada contoh c (Tabel A)

c Jika pada tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung negatif (tingkat pengenceran  $10^3$ ) tetapi tingkat pengenceran berikutnya menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran  $10^4$  menghasilkan 1 tabung positif) maka yang dinyatakan tabung positif adalah tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh d (Tabel A)

d Jika pada tingkat pengenceran tertinggi ( $10^4$ ) masih terdapat tabung positif, maka pilih tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh e (Tabel A)

**Kasus 2 Tidak ada satupun dari seri pengenceran yang menghasilkan seluruh tabung positif**

a Lihat pada contoh f (Tabel A), jika tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung positif ( $10^2$ ) maka pilih 2 tingkat pengenceran sebelumnya.

b Jika pada pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (pengenceran  $10^3$ ) menghasilkan 1 tabung positif) maka tambahkan tabung positif tersebut ke tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh g (Tabel A)

**Tabel A Cara pemilihan kombinasi seri tabung pengenceran APM dengan 5 seri tabung pengenceran**

Contoh	Tingkat pengenceran					Kombinasi tabung positif	APM/g
	$10^0$	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$		
a	5	5	1	0	0	5-1-0	33
b	4	5	1	0	0	5-1-0	33
c	5	4	4	1	0	4-4-1	40
d	5	4	4	0	1	4-4-1	40
e	5	5	5	5	2	5-5-2	5400
f	0	0	1	0	0	0-0-1	0,18
g	4	4	1	1	0	4-4-2	4,7



### Lampiran C (normatif)

Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran  $10^1$ ,  $10^2$  dan  $10^3$

Tab positif			APM/ g	Tk kepercayaan		Tab positif			APM/ g	Tk kepercayaan	
$10^1$	$10^2$	$10^3$		Bawah	Atas	$10^1$	$10^2$	$10^3$		Bawah	Atas
0	0	0	<3,0	-	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	74	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>110 0	420	--

Sumber :

Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8<sup>th</sup> edition, 1998



**Lampiran D**  
(normatif)

**Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pada pengenceran  $10^1$ ,  $10^2$  dan  $10^3$**

Tab positif			APM/g	Tk kepercayaan		Tab positif			APM/g	Tk kepercayaan	
$10^1$	$10^2$	$10^3$		Bawah	Atas	$10^1$	$10^2$	$10^3$		Bawah	Atas
0	0	0	<2,0	-	6,8	3	3	2	24	9,8	70
0	0	1	1,8	0,09	6,8	3	4	0	21	6,8	40
0	1	0	1,8	0,09	6,9	3	4	1	24	9,8	70
0	1	1	3,6	0,7	10	3	5	0	25	9,8	70
0	2	0	3,7	0,7	10	4	0	0	13	4,1	35
0	2	1	5,5	1,8	15	4	0	1	17	5,9	36
0	3	0	5,6	1,8	15	4	0	2	21	6,8	40
1	0	0	2,0	0,1	10	4	0	3	25	9,8	70
1	0	1	4,0	0,7	10	4	1	0	17	6,0	40
1	0	2	6,0	1,8	15	4	1	1	21	6,8	42
1	1	0	4,0	0,7	12	4	1	2	26	9,8	70
1	1	1	6,1	1,8	15	4	1	3	31	10	70
1	1	2	8,1	3,4	22	4	2	0	22	6,8	50
1	2	0	6,1	1,8	15	4	2	1	26	9,8	70
1	2	1	8,2	3,4	22	4	2	2	32	10	70
1	3	0	8,3	3,4	22	4	2	3	38	14	100
1	3	1	10	3,5	22	4	3	1	27	9,9	70
1	4	0	11	3,5	22	4	3	2	33	10	70
2	0	0	4,5	0,79	15	4	3	2	39	14	100
2	0	1	6,8	1,8	15	4	4	0	34	14	100
2	0	2	9,1	3,4	22	4	4	1	40	14	100
2	1	0	6,8	1,8	17	4	4	2	47	15	120
2	1	1	9,2	3,4	22	4	5	0	41	14	100
2	1	2	12	4,1	26	4	5	1	48	15	120
2	2	0	9,3	3,4	22	5	0	0	23	6,8	70
2	2	1	12	4,1	26	5	0	1	31	10	70
2	2	2	14	5,9	36	5	0	2	43	14	100
2	3	0	12	4,1	26	5	0	3	58	22	150
2	3	1	14	5,9	36	5	1	0	33	10	100
2	4	0	15	5,9	36	5	1	1	46	14	120
3	0	0	7,8	2,1	22	5	1	2	63	22	150
3	0	1	11	3,5	23	5	1	3	84	34	220
3	0	2	13	5,6	35	5	2	0	49	15	150
3	1	0	11	3,5	26	5	2	1	70	22	170
3	1	1	14	5,6	36	5	2	2	94	34	230
3	1	2	17	6,0	36	5	2	3	120	36	250
3	2	0	14	5,7	36	5	2	4	150	58	400
3	2	1	17	6,8	40	5	3	0	79	22	250
3	2	2	20	6,8	40	5	3	1	110	34	250
3	3	0	17	6,8	40	5	3	2	140	52	400
3	3	1	21	6,8	40	5	3	3	180	70	400
5	3	4	210	70	400	5	5	0	240	70	710
5	4	0	130	36	400	5	5	1	350	100	1100
5	4	1	170	58	400	5	5	2	540	150	1700
5	4	2	220	70	440	5	5	3	920	220	2600
5	4	3	280	100	710	5	5	4	1600	400	4600
5	4	4	350	100	710	5	5	5	>1600	700	--
5	4	5	430	150	1100						

Sumber : Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8<sup>th</sup> edition, 1998



## Lampiran E (normatif)

### Pembuatan media

#### E. 1 *Alkaline Peptone Water (APW)*

<i>Peptone</i>	10 g
NaCl	10 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades dan panaskan perlahan lahan. Pipet sebanyak 10 ml ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir  $8,5 \pm 0,2$ .

#### E.2 *Alkaline Peptone Salt (APS)*

<i>Peptone</i>	10 g
NaCl	30 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades dan panaskan perlahan lahan. Pipet sebanyak 10 ml ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir  $8,5 \pm 0,2$ .

#### E.3 *Decarboxylase Basal medium (Arginin, Lysine, Ornithin)*

<i>Broth Base</i>	
<i>Gelysate</i> atau <i>Peptone</i>	5 g
<i>Yeast extract</i>	3 g
<i>Glucose</i>	1 g
<i>L-lysine</i>	5 g
<i>Bromcresol Purple</i>	0,02 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades, panaskan perlahan hingga larut. Untuk arginin *Broth*, tambahkan 5 g L-arginin ke dalam 1 liter *Broth Base*; Untuk *lysine Broth* tambahkan 5 g *lysine* kedalam 1 liter *Broth Base*, tambahkan 5 g L-ornithin kedalam 1 liter *Broth Base*. Pipet sebanyak 5 ml dari masing-masing larutan *asam amino* lalu masukan ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir  $8,5 \pm 0,2$ . Untuk kontrol gunakan *Base* yang tidak diberi suplemen.



**E.4 Kliger Iron Agar**

<i>PolyPeptone Peptone</i>	20 g
<i>Lactose</i>	20 g
<i>Dekstrose</i>	1 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Ferric ammonium citrat</i>	0,5 g
<i>Sodium thiosulfate</i>	0,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Phenol red</i>	0,025 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dengan aquades hingga larut, panaskan perlahan-lahan hingga mendidih. Masukkan kedalam tabung 13 mm x 100 mm lalu tutup rapat Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir  $7,4 \pm 0,2$

**E. 5 Motility Test medium (Semisolid)**

<i>Beef extract</i>	3 g
<i>Peptone atau Gelysate</i>	10 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Agar</i>	4 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Panaskan sambil diaduk dan didihkan selama 1 – 2 menit untuk melarutkan agar. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan sampai 45°C. Tuang sebanyak 20 ml kedalam cawan petri steril, tutup dan biarkan kering. Gunakan pada hari yang sama setelah dibuat. pH akhir  $7,4 \pm 0,2$ .

**E. 6 MR-VP Broth**Medium 1

<i>Buffered Peptone-water powder</i>	7 g
<i>Glucose</i>	5 g
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	5 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Medium 2

<i>Pancreatic digest of casein</i>	3,5 g
<i>Peptic digest of animal tissue</i>	3,5 g
<i>Dextrose</i>	5 g
<i>Potassium Phosphate</i>	5 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam aquades, panaskan. Tuang sebanyak 5 ml kedalam tabung reaksi dan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir  $6,9 \pm 0,2$ .



**E.7 Purple Carbohidrat Fermentation Broth Base**

<i>Purple Broth Base</i>	15 g
Aquades	900 ml

Larutkan *Purple Broth Base* dalam aquadest dan panaskan perlahan hingga suhu 35°C. Pipet sebanyak 9 ml larutan masukan dalam tabung 16 mm x 125 mm yang telah diisi dengan tabung *durham*. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Siapkan larutan karbohidrat 5%, sterilisasi dengan menggunakan filter steril. Tambahkan 1 ml larutan karbohidrat kedalam 9 ml larutan PBB sehingga konsentrasi akhir karbohidrat dalam *Broth* mencapai 0,5%. PH akhir 6,8 ± 0,2.

Untuk analisa *Vibrio prahaemolyticus*, tambahkan media dengan NaCl sehingga konsentrasi NaCl akhir sekitar 2% – 3%

**E.8 Oxidative-Fermentative (OF) Test Medium***Base*

<i>Peptone</i>	2 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
<i>Bromthymol Blue</i>	0,03 g
Agar	2,5 g
Aquades	1 liter

Larutkan bahan dalam aquades lalu panaskan dengan hot plate stirer hingga mendidih. Pipet sebanyak 2,7 ml agar cair lalu masukkan dalam tabung 13 x 100 mm. Sterilisasi dengan *Autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,1.

**Larutan stok karbohidrat.** Larutkan 10 g karbohidrat dalam 90 ml aquades. Sterilisasi dengan membran filter 0,22 µm. Tambahkan 0,3 ml stok karbohidrat kedalam 2,7 ml *Base* dalam tabung. Kocok agar karbohidrat tercampur sempurna pada suhu ruang. Buat tabung yang sama secara duplo, Salah satu tabung dilapisi dengan mineral oil steril. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam.

**E.9 Triple Sugar Iron (TSI) Agar**Media 1

<i>PolyPeptone</i>	20 g
NaCl	5 g
<i>Laktose</i>	10 g
<i>Sucrose</i>	10 g
<i>Glucose</i>	1 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2 g
<i>Phenol red</i>	0,025 g
Agar	13 g
Aquadest	1 liter

Media 2

<i>Beef extract</i>	3 g
<i>Yeast extract</i>	3 g
<i>Peptone</i>	15 g
<i>Proteose Peptone</i>	5 g
<i>Glucose</i>	1 g
<i>Lactose</i>	10 g
<i>Sucrose</i>	10 g
FeSO <sub>4</sub>	0,2 g
NaCl	5 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,3 g
<i>Phenol red</i>	0,024 g
Agar	12 g
Aquades	1 liter



Kedua media dapat ditukar untuk keperluan umum. Larutkan semua bahan Media I dalam 1 liter aquadest dan panaskan sambil sesekali diaduk. Didihkan selama 1 menit agar semua bahan terlarut. hingga mendidih. Sterilisasi media pada suhu 118°C selama 15 menit. Siapkan media 2 seperti pada media 1, kecuali sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum media menjadi padat, miringkan tabung agar memperoleh agar miring 4 cm - 5 cm dan agar dasar 2 cm - 3 cm pH akhir  $7,3 \pm 0,2$  (Media 1) dan  $7,4 \pm 0,2$  (Media 2)

#### E.10 Thiosulfate-Citrate-BileSalts-Sucrose (TCBS) Agar

<i>Yeast extract</i>	5 g
<i>Peptone</i>	10 g
<i>Sucrose</i>	20 g
<i>Sodiumthiosulfate</i> 5 H <sub>2</sub> O	10 g
<i>Sodiumcitrate</i> 2H <sub>2</sub> O	10 g
<i>Sodium cholate</i>	3 g
<i>Oxgall</i>	5 g
Na Cl	10 g
<i>Ferric citrate</i>	1 g
<i>Bromthymol Blue</i>	0,04 g
<i>Thymolblue</i>	0,04 g
Agar	15 g
Aquades	1 liter

Siapkan labu erlenmeyer yang berukuran lebih besar dari volume media yang akan dibuat. Larutkan seluruh bahan dalam aquades hangat dan panaskan hingga larut. Setelah mendidih cepat angkat. Jangan di *Autoclave*. Dinginkan hingga suhu 50°C dan tuang kedalam cawan petri steril. Keringkan cawan petri tersebut selama 1 malam atau pada suhu 37°C - 45°C sebelum digunakan.

#### E.11 Tryptone (Tryptophane) Broth 1%

<i>Tryptone</i> atau <i>Trypticase</i>	10 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dan pindahkan sebanyak 5 ml tabung reaksi. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15. pH akhir  $6,9 \pm 0,2$ .

#### E.12 Trypticase (tryptic) Soy Agar

<i>Trypticase Peptone</i>	15 g
<i>Tryptone Peptone</i>	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dan didihkan. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir  $7,3 \pm 0,2$ .



### E.13 *Tryptone Broth and Tryptone Salt Broths* ( $T_1N_0$ , $T_1N_1$ $T_1N_3$ $T_1N_6$ $T_1N_8$ $T_1N_{10}$ )

<i>Trypticase</i> atau <i>Tryptone</i>	10 g
NaCl	0 g, 10 g, 30 g, 60 g, 80 g, 100 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades. Untuk  $T_1N_0$  tanpa penambahan NaCl; untuk  $T_1N_1$  gunakan 10 g NaCl (1% w / v NaCl) dan seterusnya. Tuang ke dalam tabung bertutup ukuran 16 mm x 125 mm. Tutup rapat tabung untuk mempertahankan konsentrasi garam yang terdapat dalam larutan tersebut. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir  $7,2 \pm 0,2$ .

### E.14 *Urea Broth*

<i>Urea</i>	20 g
<i>Yeast extract</i>	0,1 g
$Na_2HPO_4$	9,5 g
$K_2HPO_4$	9,1 g
<i>Phenol red</i>	0,01 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dalam 1 liter aquadest. **Jangan dipanaskan.** Sterilisasi menggunakan membran filter 0,45  $\mu m$ . Pindahkan 0,1 ml - 3,0 ml ke dalam tabung steril. pH akhir  $6,8 \pm 0,2$ .



## Lampiran F (normatif)

### Pembuatan pereaksi

#### F.1 Pereaksi Kovacs'

<i>P-DimEthylaminobenzaldehyde</i>	5 g
<i>Amyl Alcohol</i> (normal)	75 ml
HCl (pekat)	25 ml

Larutkan *P-DimEthylaminobenzaldehyde* dalam *Amyl Alcohol* normal. Tambahkan HCl perlahan-lahan. Simpan pada suhu 4°C. Untuk uji indol, tambahkan 0,2 ml – 0,3 ml reagen kedalam 5 ml kultur *Tryptone Broth* yang diinkubasi 24 jam. Terbentuknya cincin merah pada permukaan menunjukkan hasil yang positif.

#### F.2 Mineral (Parafin) oil

Pereaksi ini tersedia secara komersial.

#### F.3 O / 129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) disk, 10 µg dan 150 µg

Pereaksi ini tersedia secara komersial.

#### F.4 Uji ONPG

##### Larutan *Monosodium Phosphat* 1,0M pH 7

Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	6,9 g
Aquades	45 ml
Larutan NaOH 30% (w / v)	3 ml

Larutkan Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> .H<sub>2</sub>O dalam aquades. Tambahkan larutan NaOH 30% dan atur pH menjadi 7. Tepatkan volume dengan aquades dan simpan dalam refrigerator (kira-kira 4°C).

##### 0,0133 M *o*-Nitrophenyl-beta-D-galaktoside (ONPG)

ONPG	80 mg
Aquades, 37°C	15 ml
Larutan <i>Monosodium Phosphat</i> 1,0M pH 7	5 ml

Larutkan ONPG dalam aquades 37°C. Tambahkan larutan 1,0M Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>. Larutan ini tidak berwarna. Simpan dalam refrigerator (kira-kira 4°C). Sebelum digunakan, panaskan sesuai kebutuhan larutan ONPG pada suhu 37°C.

#### F.5 Peraksi oksidase

N,N,N, N – TetramEthyl-p-phenylenediamine 2 HCl	1 g
---	-----



Aquades 100 ml

Siapkan peraksi dalam kondisi segar. Peraksi ini dapat disimpan hingga 7 hari dalam botol gelas dalam refrigerator. Pereksi ini juga tersedia dalam bentuk kertas *oksidase*.

#### F.6 1N Hydrochloric acid

HCl 89 ml  
Aquades untuk melarutkan hingga 1 liter

#### F.7 Larutan *Physiological Saline* 0,85%

NaCl 8,5 g  
Aquadest 1 liter  
Larutkan 8,5 g NaCl dalam aquades. Sterilisasikan pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### F.8 *Phosphate Buffered Saline* (PBS), pH 7,4

NaCl 7,650 g  
Na<sub>2</sub> H PO<sub>4</sub>, *anhydrous* 0,724 g  
K H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0,210 g  
Aquades 1 liter  
Larutkan seluruh bahan dalam aquades. Atur pH menjadi 7,4 dengan 1 N NaOH. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### F.9 Larutan 2% atau 3% NaCl

Larutan 2% NaCl  
NaCl 20 g  
Aquades 1 liter

Larutan 3% NaCl  
NaCl 30 g  
Aquades 1 liter

Larutkan bahan dalam aquades. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, pH akhir 7,0.

#### F.10 Larutan 1 N *Sodium Hydroxide Solution*

NaOH 40 g  
Aquadest 100 ml  
Larutkan NaOH dalam aquades

#### F. 11 Peraksi VP

Larutan 1  
*Alpha-naphtol* 5 g  
*Alcohol* (absolut) 100 ml



Larutan 2

<i>Potassium hydroxide</i>	40 g
Aquades	100 ml

**Uji VP.** Pindahkan 1 ml kultur 48 jam kedalam tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml larutan 1 dan 0,2 ml larutan 2. Kocok setelah penambahan larutan. Untuk mempercepat reaksi, tambahkan kristal creatine kedalam campuran larutan. Biarkan pada suhu ruang. Baca hasilnya setelah 4 jam. Pembentukan warna eosin pink menunjukkan hasil yang positif.

**F.12 Perekasi pewarnaan Gram*****Hucker's Crystal violet*****Larutan A**

<i>Crystal violet</i>	2 g
<i>Ethyl Alcohol, 95 %</i>	20 ml

**Larutan B**

<i>Ammonium oxalat</i>	0,8 g
Aquades	80 ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring dengan kertas saring.

***Gram's Iodine***

<i>Iodine</i>	1 g
<i>Potassium Iodine</i>	2 g
Aquades	300 ml

Masukkan KJ dalam mortar, tambahkan *Iodine* dan gerus dengan alat penggiling selama 5-10 detik. Tambahkan 1 ml air dan gerus kemudian tambahkan 5 ml. Tambahkan lagi 10 ml dan gerus. Tuang larutan ini dalam botol pereaksi. Bilas mortar dan alat penggilingnya dan tambahkan air hingga volume 300 ml.

***Hucker's Counterstain (larutan stok)***

<i>Safranin O</i>	2,5 g
<i>Ethanol, 95 %</i>	100 ml

Larutan kerja: larutkan 10 ml larutan stok ke dalam 90 ml aquades.

**Prosedur pewarnaan :**

Buat usapan bakteri yang akan diwarnai diatas gelas preparat. Usahkan usapan yang dibuat setipis mungkin. Fiksasi gelas preparat tersebut dengan melewati melalui api burner. Warna film selama 1 menit dengan larutan *Hucker's Crystal violet* dan cuci sebentar dengan air. Bubuhkan larutan g *Iodine* selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir. Lakukan dekolorisasi (penghilangan warna) dengan *Ethanol 95 %* hingga seluruh warna biru hilang (kira-kira 30 detik). Cuci kembali dengan air mengalir. Bubuhkan larutan *Hucker's Counterstain (Safranin)* selama 1 menit dan cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dan periksa di bawah mikroskop.



## Bibliografi

Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual*. 8<sup>th</sup> edition, 1998. Chapter 9. AOAC International.























**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)